

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.  
Vol. 19, 1981, pp. 1181–1187

## Katalytische Konzentration, multiple Formen und Lektinaffinität von mikrosomalen Enzymen menschlicher Gewebe

### *Lektine als Reagentien, II. Mitteilung*

Von K. Lorentz

Aus dem Institut für Klinische Chemie (Direktor: Prof. Dr. K. Lorentz) der Medizinischen Hochschule Lüneburg

(Eingegangen am 16. März/24. August 1981)

Herrn Prof. Dr. J. Kühnau zum 80. Geburtstag gewidmet

**Zusammenfassung:** Es wurden die katalytischen Konzentrationen, multiplen Formen und Lektinaffinitäten von Arylamidase, alkalischer Phosphatase,  $\gamma$ -Glutamyltransferase, Cholinesterase und Arylesterase in partikelfreien Extrakten menschlicher Gewebe untersucht. Alle Enzyme bis auf Arylesterase reagierten intensiv mit den Lektinen aus *Ricinus communis* (Typ 120), *Canavalia ensiformis*, *Triticum vulgare* und *Phaseolus vulgaris* S, während die Agglutinine aus *Glycine max*, *Arachis hypogaea* und *Ulex europaeus* kaum präzipitierten. Diese Reaktionen wurden stärker von der Herkunft als von der Art des Enzyms bestimmt. Da die Abspaltung von N-Acetylneuraminsäure die Fällung durch *Triticum vulgare*-Lektin immer verminderte und in Extrakten aus normalem Leberparenchym sogar aufhob, sind Sialoenzyme offenbar regelhaft bereits intrazellulär vorhanden. Abweichende Reaktionen von Enzymen aus intaktem und carcinomatösem Lebergewebe fanden sich nicht in den Seren entsprechender Patienten wieder. Dasselbe traf für die Muster multipler Formen zu. Die Ursachen dieser Unterschiede werden erörtert.

*Catalytic concentration, multiple forms, and lectin affinity of microsomal enzymes from human tissues*

*Lectins as reagents, II.*

**Summary:** We estimated the concentrations, multiple forms, and lectin binding of five microsomal enzymes in particle free extracts from human kidney, pancreas, jejunal mucosa, and normal and cancerous liver. While arylesterase markedly reacted only with concanavalin A, arylamidase, alkaline phosphatase,  $\gamma$ -glutamyltransferase, and cholinesterase were intensely precipitated by lectins from *Ricinus communis* 120, *Canavalia ensiformis*, *Triticum vulgare* and *Phaseolus vulgaris* S. Agglutinins from *Glycine max*, *Arachis hypogaea* and *Ulex europaeus* proved less effective. The reaction mainly depended on the origin of enzymes not on their species. Desialylation always decreased precipitation, and in extracts of normal liver parenchyma it even totally abolished precipitation, by *Triticum vulgare* lectin. Sialoenzymes therefore appear to be normal intracellular constituents. Differences between enzymes from normal and cancerous liver were not reflected by variant properties of the corresponding activities in sera. The same held true for multiple forms. The reasons for these differences are discussed.

### Einführung

Die Reaktion verschiedener Lektine mit mikrosomalen Enzymen im Serum zeigte komplexe Muster, deren Deutung unsicher war und nur bei bösartigen Tumoren und bei chronisch entzündlichen Leberleiden diagnostische Hinweise gab (1). Daher untersuchten wir das Verhalten dieser Enzyme in den partikelfreien Rohextrakten jener Organe, die als Ursprungsorte der Aktivität im Serum gelten. Hierzu wurden von fünf mikrosomalen

Enzymen die katalytischen Konzentrationen, multiplen Formen und Lektinaffinitäten bestimmt.

### Material und Methoden

#### Material

Alle Proben stammten aus identischen Arealen makroskopisch unauffälliger Organe: Lebergewebe aus dem rechten Lappen (zentral), Jejunummucosa vom proximalen Ende (10 cm unter der flexura duodenojejunalis), Nierenrinde aus dem oberen Pol des Organs, Knochen vom Sternum an Costalgelenken und Pan-

0340-076X/81/0019-1181\$02.00

© by Walter de Gruyter & Co. · Berlin · New York

kreasparenchym aus der Mitte der Cauda pancreatis<sup>1</sup>). Die auch histologisch unveränderten Gewebeproben wurden, ebenso wie Excisate aus nicht nekrotischen Lebermetastasen, intraoperativ oder 10–24 h nach dem Tode entnommen, von bindegewebigen Anteilen befreit, in etwa 0,2 g wiegende Stücke zerschnitten und mit Natriumchlorid 155 mmol/l möglichst frei von Blut gespült. Knochen wurde mit einem Hammer zerschlagen und anschließend wie die anderen Gewebe mit 5 Tln. Triton X-100 10 g/l in Pufferlösung C unter Eiskühlung 4 × 10 s mittels Ultra-Turrax (Jahnke & Kunkel, Staufen) und 1 × 20 s mit einem Gaspistill nach *Potter-Elvehjem* homogenisiert und dann bei – 28 °C eingefroren. Alle Homogenate tauten wir ohne nachweisbaren Aktivitätsverlust innerhalb eines Monats auf und zentrifugierten sie bei 0 °C 60 min mit 100 000 × g. Durch diese Behandlung in Gegenwart eines Detergenz' gelangten mehr als 95% der Enzymaktivität in den partikelfreien Überstand. Ein probatorischer Zusatz von Triton X-100 zu detergentfreien Organextrakten bis zur verwendeten Endkonzentration von 8,3 g/l veränderte weder die Affinität zu Lektinen noch die gemessene katalytische Konzentration der Enzyme.

Alle Reagentien und Lösungen entsprachen denen der I. Mitteilung (1), auch die Lektine. Den Konzentrationsangaben im Ansatz lagen die dort aufgeführten Molekulargewichte zugrunde.

#### Methoden

Wie bei den Untersuchungen mit *Seren* (1) wurden gleiche Tle. von partikelfreiem Extrakt und Pufferlösung gemischt und 2 h bei 25 °C inkubiert. Zur Fällung wurden die verwendeten Lektine der Lösung C, bei Vorbehandlung mit Neuraminidase (50 000 E/l, 16 h bei 25 °C), die in Lösung A enthalten war, dagegen der Lösung B zugesetzt, um einen pH-Wert von 7,0–7,2 im Ansatz zu garantieren.

Lösung A (Acetat-Tris 250 mmol/l, Calciumchlorid 20 mmol/l, pH 5,0)

Lösung B (Tris-Acetat 500 mmol/l, Calciumchlorid 2 mmol/l, Magnesiumchlorid 2 mmol/l, pH 7,7)

Lösung C (Tris-Acetat 100 mmol/l, Calciumchlorid 500 µmol/l, Magnesiumchlorid 500 µmol/l, Mangan(II)chlorid 10 µmol/l, pH 7,2)

In den nach Zentrifugation (3 min mit 120 000 × g) der Ansätze resultierenden Überständen wurden die katalytischen Konzentrationen der Enzyme im Mikroverfahren (1) bei 25 °C und ihre Verteilung bei diskoelektrophoretischer Trennung (1) ermittelt. In den als Ausgangsmaterial verwendeten partikelfreien Extrakten bestimmten wir die Proteinkonzentration nach *Richterich* (2) mit Biuret-Reagenz gegen Probenleerwerte, die ebenso wie der Albuminstandard und der Reagenzleerwert die Tritonkonzentration der Proben aufwiesen.

Im einzelnen wurden folgende Bestimmungen und Verfahren benutzt:

Arylamidase, mikrosomal (EC 3.4.11.2) nach I.c. (3), alkalische Phosphatase (EC 3.1.3.1) nach I.c. (4),  $\gamma$ -Glutamyltransferase (EC 2.3.2.2) nach I.c. (5) und Cholinesterase (EC 3.1.1.8) nach I.c. (6). Da, im Gegensatz zum Serum, Organextrakte außer Arylesterase weitere phenylacetatspaltende Carboxylesterasen (EC 3.1.1.-) enthalten, wurde dieses Enzym (EC 3.1.1.2) in Gegenwart von Paraoxon 1 µmol/l nach I.c. (7) gemessen.

Die multiplen Formen der Enzyme wurden in Polyacrylamidgradientengelen (8) nach I.c. (1) dargestellt, die der  $\gamma$ -Glutamyltransferase nach *Patel & O'Gorman* (9).

Zum Vergleich der spezifischen Aktivitäten in normalem und maligne in entartetem Lebergewebe diente der *Wilcoxon*-Rangsummen-Test für nicht korrelierte Stichproben. Ein Zusammenhang der Meßdaten verschiedener Enzyme im selben Organ wurde mit der Rangkorrelation nach *Spearman* geprüft.

<sup>1</sup>) Herrn Prof. Dr. A. Gropp (Direktor des Instituts für Pathologie der Med. Hochschule Lübeck), Herrn Prof. Dr. O. Pribilla (Direktor des Instituts für Rechtsmedizin der Med. Hochschule Lübeck) und Herrn Prof. Dr. J. Durst (Chefarzt der Chirurgischen Klinik des Städt. Krankenhauses Lübeck) danke ich für die Überlassung der Proben.

## Ergebnisse

### Spezifische Aktivität

Da autolytisch verändertes Material verworfen wurde, unterschieden sich die katalytischen Konzentrationen der solubilisierten Enzyme aus intraoperativ und post mortem entnommenen Proben nicht voneinander. Eine Übersicht aller Ergebnisse bietet Tabelle 1. Vergleicht man die spezifische Aktivität der verschiedenen Enzyme jeweils in derselben Gewebeprobe, so zeigen ihre Werte zumeist kein konstantes Muster. Daher enthält Tabelle 2 nur statistisch signifikante Korrelationen zwischen bestimmten Aktivitäten.

Arylamidase und Cholinesterase wiesen die engsten Verteilungsbereiche auf, während die spezifische Aktivität der Arylesterase am stärksten streute. Vergleiche mit den Ergebnissen anderer Autoren (Leber: I.c. (10–14); Niere: I.c. (12, 15, 16); Jejunum: I.c. (17, 18); Knochen: I.c. (19)) sind wegen der unterschiedlichen Testverfahren und Meßtemperaturen problematisch. Die hier mitgeteilten Werte lassen sich hingegen mit den katalytischen Konzentrationen im Serum in Bezug setzen. Auffällig war dabei die gegenüber dem Serum geringe Aktivität beider Esterasen.

Die spezifischen Aktivitäten korrelierten am häufigsten und engsten im Metastasengewebe. Dies ist offenbar ein Ausdruck der Entdifferenzierung, da hier, im Gegensatz zu reifenden Epithelzellen des gesunden Gewebes, Altersunterschiede einzelner Zellen mit ihrem Wandel der Enzymgarnitur weitgehend fehlen. Gleichwohl konnten die Aktivitätsmuster dem histologischen Typ der Metastasen nicht zugeordnet werden. Dies galt auch für die Exportproteine Cholinesterase und Arylesterase, als deren Herkunftsort der normale Hepatocyt zu gelten hat. Andererseits zeigte kein untersuchtes Enzym einen statistisch signifikanten Unterschied seiner spezifischen Aktivität zwischen Metastasen- und normalem Lebergewebe. Weiterhin fehlte im neoplastisch veränderten Parenchym ein typisches Enzymmuster.

### Multiple Formen

Bei der elektrophoretischen Trennung entsprachen Anzahl und Reihenfolge der Fraktionen im Gradientengel weitgehend den Ergebnissen eigener Untersuchungen mit Stufengelen an alkalischer Phosphatase (20) und Arylamidase (21) aus Rohhomogenaten. Sie stimmten auch mit Beobachtungen an gereinigter alkalischer Phosphatase (17) und  $\gamma$ -Glutamyltransferase (13) überein. Die Zusammenfassung aller Zymogramme (Tab. 3) ließ eine – gegenüber intaktem Lebergewebe – deutliche Verminderung der multiplen Formen aller fünf Enzyme bei maligner Entartung erkennen. Dagegen waren die – hier nicht aufgeführten – Laufstrecken der schnellsten Fraktionen bei beiden Geweben identisch und würden durch Vorbehandlung mit Neuraminidase in gleichem Ausmaß verlangsamt. Im übrigen ergaben sich, unab-

Tab. 1. Konzentration (U/g Protein) fünf mikrosomaler Enzyme im partikelfreien Überstand von 17 Rohextrakten menschlicher Gewebe.  
Bereich (jeweils obere Reihe), Mittelwert und Standardabweichung (darunter) und Verteilungstyp:  
\* normal, • lognormal, + nicht nachweisbar

Gewebe	Arylamidase U/g	Alkalische Phosphatase U/g	$\gamma$ -Glutamyl- transferase U/g	Cholinesterase U/g	Arylesterase U/g
Leber	2,35 – 22,2* 8,52 $\pm$ 1,94	8,78 – 141* 39,2 $\pm$ 32,2	13,9 – 105* 50,2 $\pm$ 31,6	4,40 – 48,3* 18,1 $\pm$ 2,58	32,2 – 1570 <sup>+</sup>
Leber- metastasen <sup>1)</sup>	4,65 – 53,2* 15,0 $\pm$ 12,5	4,92 – 203 <sup>+</sup>	28,2 – 154* 89,6 – 81,6	4,74 – 43,9* 9,90 $\pm$ 4,22	31,9 – 968 <sup>+</sup>
Niere (Cortex)	10,8 – 273* 146 $\pm$ 77,6	8,47 – 55,5* 28,4 $\pm$ 12,6	43,6 – 1490* 689 $\pm$ 431	1,93 – 21,3* 8,65 $\pm$ 4,63	33,2 – 166 <sup>+</sup>
Pankreas	6,50 – 47,7* 24,7 $\pm$ 14,4	2,30 – 138 <sup>+</sup>	4,40 – 851 <sup>+</sup>	9,11 – 35,1* 18,3 $\pm$ 5,34	10,7 – 304
Jejunummucosa	16,5 – 129* 48,3 $\pm$ 30,4	34,9 – 685 <sup>+</sup>	13,2 – 83,7* 34,7 $\pm$ 18,5	23,4 – 78,6* 54,1 $\pm$ 19,8	17,6 – 201* 77,3 $\pm$ 56,6
Knochen	–	6,30 – 247 <sup>+</sup>	–	–	–

<sup>1)</sup> Histologischer Typ des Metastasengewebes: Entdifferenziertes Carcinom der Gallenwege 4, kleinzelliges Bronchialcarcinom 5, Magencarcinom vom intestinalen Typ 3, Adenocarcinom der Mamma 2, verhornendes Plattenepithelcarcinom (vom Collum uteri) 2.

Tab. 2. Korrelation der katalytischen Konzentration mikrosomaler Enzyme im partikelfreien Überstand von 17 Rohextrakten menschlicher Gewebe.  $\rho$  = Korrelationskoeffizient,  $p$  = Irrtumswahrscheinlichkeit (nach Spearman).

Organ		$\rho$	$p$
Kenngrößen			
<b>Leber</b>			
Arylamidase – Alkal. Phosphatase	0,522	< 0,05	
Arylamidase – $\gamma$ -Glutamyltransferase	0,655	< 0,01	
Cholinesterase – Arylesterase	0,605	< 0,05	
<b>Lebermetastasen</b>			
Arylamidase – Alkal. Phosphatase	0,770	< 0,01	
Arylamidase – $\gamma$ -Glutamyltransferase	0,720	< 0,01	
Arylamidase – Arylesterase	0,686	< 0,01	
Alkal. Phosphatase – $\gamma$ -Glutamyltransferase	0,631	< 0,05	
Alkal. Phosphatase – Arylesterase	0,704	< 0,01	
Cholinesterase – Arylesterase	0,872	< 0,01	
<b>Pankreas</b>			
Arylamidase – $\gamma$ -Glutamyltransferase	0,781	< 0,01	
<b>Niere (Cortex)</b>			
Arylamidase – $\gamma$ -Glutamyltransferase	0,590	< 0,05	
Cholinesterase – Arylesterase	0,908	< 0,01	

hängig vom Lebens- und Entnahmealter, zwischen verschiedenen Proben desselben Organs nur geringe Unterschiede durch das gelegentliche Auftreten von langsam wandernden Minorbanden, die weniger als 30% der Aktivität von Hauptfraktionen enthielten.

#### Lektinaffinität

In der vorausgegangenen Studie an Seren (1) waren nur sieben von zehn geprüften Lektinen zur Unterscheidung

Tab. 3. Multiple Formen von fünf mikrosomalen Enzymen in partikelfreien Überständen von Rohextrakten menschlicher Organe. Angabe der Bandenzahl bei Elektrophorese im Polyacrylamidgradientengel, ( ) = inkonstantes Auftreten kathodischer Minorfraktionen (mit weniger als 30% Aktivität der Hauptfraktionen).

Gewebe	Aryl- amidase	Alka- lische Phos- phatase	$\gamma$ -Glut- amyl- trans- ferase	Cholin- esterase	Aryl- esterase
Leber	2 (– 3)	2	1	3 (– 4)	6
Leber- metastasen	1 (– 2)	1	1	3	2
Niere (Cortex)	2	2	1	2	4
Pankreas	2	2	3	1	1 (– 2)
Jejunum- mucosa	2 (– 3)	2	1	2	1
Knochen	1	2	–	–	–

von Gesunden, Leberkranken und Carcinomträgern geeignet. Daher verwendeten wir diese, z. T. schlecht löslichen, Agglutinine in höchstmöglicher Konzentration. Die Summe der Aktivität in Überstand und Niederschlag entsprach den Ausgangswerten.

*Arachis hypogaea*-Lektin 10  $\mu$ mol/l und *Ulex europaeus*-Lektin (Typ I) 50  $\mu$ mol/l fällten keines der untersuchten Enzyme aus den partikelfreien Organextrakten, so daß dort zugängliche Galaktose- und Fucosereste fehlen dürften. Arylesterase reagierte nur mit Concanavalin A, offenbar infolge exponierter Mannoseeinheiten in ihrem Kohlenhydratanteil. Während mit anderen Lektinen nach der Inkubation 0,92–0,99 der Ausgangsaktivität (= 1,0) im Überstand verblieben, lauteten die Werte ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 12$ ) nach Präzipitation mit Concanavalin A 80  $\mu$ mol/l

0,216  $\pm$  0,086 bei normalem Lebergewebe, 0,552  $\pm$  0,147 in Metastasen der Leber, 0,363  $\pm$  0,163 in der Nierenrinde, 0,609  $\pm$  0,260 im Pankreas und 0,570  $\pm$  0,146 in der Jejunummucosa.

Eine Synopsis über die Lektinaffinität der anderen Enzyme zeigt das abweichende Verhalten von Cholinesterase (Tab. 4). Ordnet man die Ergebnisse nach Organen, so reagieren die Aktivitäten der Jejunummucosa, Cholinesterase ausgenommen, am schwächsten mit Lektinen. Betrachtet man die Resultate im Hinblick auf den Einfluß der Agglutinine, so fällt das *Ricinus communis* 120-Lektin trotz geringster Konzentration am wirkungsvollsten die Enzyme aller Organe, wiederum mit Ausnahme der Cholinesterase. Geht man von den Enzymen aus, dann nimmt Cholinesterase eine Sonderstellung ein: In Extrakten aus Jejunumschleimhaut wird sie von den vier Lektinen aus *Canavalia ensiformis*, *Triticum vulgare*, *Phaseolus vulgaris* S und *Ricinus communis* 120 deutlich stärker, in den Extrakten aus normalem und carcinomatösem Lebergewebe jedoch wesentlich schwächer gefällt als die anderen Enzyme. Auch bei der Untersuchung von Nieren- und Pankreasgewebe war Cholinesterase gegenüber den genannten Agglutininen mit Ausnahme von Concanavalin A weit aus resistenter als die übrigen Aktivitäten.

Die Behandlung mit Neuraminidase veränderte in keinem Gewebe, trotz des abweichenden pH-Wertes während der Inkubation, die ursprünglich gemessene Enzymkonzentration. Nur die alkalische Phosphatase des Knochengewebes nahm in ihrer Aktivität um den Faktor 1,29  $\pm$  0,22 zu. Im einzelnen waren folgende Reaktionen hervorzuheben:

*Glycine max*-Lektin 20  $\mu$ mol/l war wenig wirksam und fällte nur in Pankreasextrakten. Erst nach Vorbehandlung mit Neuraminidase reagierten alle Enzyme aus Metastasegewebe, sowie die alkalische Phosphatase,  $\gamma$ -Glutamyltransferase und Cholinesterase der Niere. Dagegen waren Aktivitäten aus den Extrakten von normalem Leberparenchym und Jejunummucosa auch nach Abspaltung von Sialinsäure nicht zu fällen. Die Reaktionen verhielten sich also eher organ- als enzyspezifisch.

Während mit diesem Agglutinin ein Nachweis von Galaktose- und/oder N-Acetylgalaktosaminresten kaum gelang, präzipitierte *Phaseolus vulgaris* S-Lektin, das bei ähnlichem Molekulargewicht eine identische Zuckerspezifität aufweist, schon bei gleicher Konzentration wesentlich stärker und bei 40  $\mu$ mol/l sehr effektiv (s. Tab. 4). Auch sein Verhalten war organotypisch, da, abgesehen von der Cholinesterase, die der Niere entstammenden Aktivitäten am besten gefällt wurden.

Da Agglutinin 120 aus *Ricinus communis* ebenfalls – bei übereinstimmendem Molekulargewicht – gegen Galaktosereste gerichtet ist, war ein ähnliches Reaktionsmuster zu erwarten. Tatsächlich verhielten sich beide Agglutinine weitgehend gleich. Größere Abwei-

chungen traten nur bei der Reaktion von Arylamidase, alkalischer Phosphatase und  $\gamma$ -Glutamyltransferase aus intaktem und maligne entartetem Leberparenchym auf. Sie verlief mit *Ricinus communis* 120-Lektin intensiver. Überhaupt ist dieses Agglutinin optimal zur Fällung aller alkalischen Phosphatasen mit Ausnahme der intestinalen Aktivität geeignet.

Überraschenderweise trat nach Abspaltung von endständiger N-Acetylneuraminsäure bei Leberextrakten statt der erwarteten Reaktionszunahme eine – teilweise eindrucksvolle – Verminderung der Lektinaffinität ein. Sie wurde beim Agglutinin aus *Triticum vulgare* ausnahmslos beobachtet und führte bei den Enzymen der Leber sogar zur Aufhebung der Reaktion. Da dieses Lektin neben N-Acetylglucosamin- auch N-Acetylgalaktosamin- (22) und vor allem N-Acetylneuraminsäurereste (22, 23, 24) erfaßt, bedeutet der Verlust der Bindungsfähigkeit, daß in den Enzymen hepatischer Herkunft Sialinsäure als einziger Partner erscheint, in allen anderen aber zumindest als obligater Bestandteil vorkommen muß. So war das Fehlen von Sialoenzymen in allen untersuchten Geweben auszuschließen.

Problematischer erscheint die nach Einwirkung von Neuraminidase abnehmende Reaktion mit anderen Lektinen. Bei Concanavalin A betraf sie selektiv die vier Enzyme aus normaler Leber, bei *Ricinus communis* 120- und *Phaseolus vulgaris* S-Lektin ebenfalls die hepatischen Aktivitäten, Cholinesterase ausgenommen. Weiterhin wurde mit dem zuletzt genannten Agglutinin eine verminderte Reaktion bei sämtlichen alkalischen Phosphatasen und allen  $\gamma$ -Glutamyltransferasen (außer bei der intestinalen) beobachtet. Durch Mitführen nicht hydrolysiertes 4-Nitrophenylglucoside konnte eine Verunreinigung der Ansätze durch andere Glucosidasen mit konsekutiver Abspaltung von Zuckern ausgeschlossen werden. Auch eine Modifikation des Bindungsverhaltens durch autolytisch aus den Proben freigesetzte Proteasen erscheint unwahrscheinlich, da wegen der langen Inkubation bei pH 5 ein Ansatz ohne Neuraminidase als Bezugswert (= 1,0) für diese Versuche verwendet wurde. In keinem Fall verstärkte die Vorinkubation mit Neuraminidase die Reaktion von Enzymen mit Concanavalin A, so daß eine Bindungshemmung durch terminale Sialinsäurereste, wie sie für  $\gamma$ -Glutamyltransferasen angenommen wurde (25), entfällt.

Die Muster der multiplen Formen erfuhren durch die Behandlung mit Lektinen keine qualitative Veränderung, wenn man von der Verzögerung einzelner Fraktionen durch Bildung höhermolekularer Protein-Lektin-Komplexe absieht. In den angewandten Konzentrationen reduzierte das Agglutinin 120 aus *Ricinus communis* die Intensität aller Banden am deutlichsten, wie aus den Untersuchungen der Gesamtaktivität zu erwarten war. Eine selektive Elimination einzelner Fraktionen fand nicht statt. Vorherige Hydrolyse mit Neuraminidase veränderte die Muster der multiplen Formen nicht.

Tab. 4. Relative Aktivität in den Überständen partikelfreier Extrakte von menschlichen Organen nach Fällung mit Lektinen, bezogen auf die ursprüngliche katalytische Konzentration (1,0) ohne (jeweils obere Reihe) oder mit Neuraminidasevorbehandlung (jeweils untere Reihe). Mittelwert und Standardabweichung aus der Untersuchung von 12 verschiedenen Proben, Vorgehen s. Methodik.

	<i>Canavalia ensiformis</i> 80 µmol/l	<i>Triticum vulgare</i> 80 µmol/l	<i>Phaseolus vulgaris</i> S 40 µmol/l	<i>Ricinus communis</i> 120 15 µmol/l	<i>Glycine max</i> 20 µmol/l
<b>Leber</b>					
Arylamidase	0,110 ± 0,106 0,210 ± 0,195	0,215 ± 0,112 0,940 ± 0,180	0,274 ± 0,152 0,810 ± 0,220	0,071 ± 0,069 0,580 ± 0,120	1,020 ± 0,030 0,865 ± 0,105
Alkalische Phosphatase	0,196 ± 0,102 0,463 ± 0,228	0,126 ± 0,107 0,992 ± 0,063	0,308 ± 0,112 0,390 ± 0,131	0,038 ± 0,024 0,161 ± 0,098	0,975 ± 0,085 0,967 ± 0,077
γ-Glutamyltransferase	0,136 ± 0,075 0,576 ± 0,219	0,181 ± 0,076 0,979 ± 0,051	0,402 ± 0,210 0,910 ± 0,040	0,067 ± 0,043 0,740 ± 0,312	1,002 ± 0,018 0,959 ± 0,043
Cholinesterase	0,245 ± 0,177 0,510 ± 0,321	0,680 ± 0,128 1,030 ± 0,082	0,768 ± 0,157 0,802 ± 0,176	0,775 ± 0,201 0,833 ± 0,234	0,996 ± 0,265 1,033 ± 0,041
<b>Lebermetastasen</b>					
Arylamidase	0,469 ± 0,100 0,393 ± 0,150	0,207 ± 0,196 0,792 ± 0,180	0,246 ± 0,220 0,266 ± 0,213	0,173 ± 0,220 0,079 ± 0,052	0,990 ± 0,044 0,482 ± 0,147
Alkalische Phosphatase	0,390 ± 0,184 0,252 ± 0,163	0,066 ± 0,062 0,716 ± 0,221	0,234 ± 0,123 0,462 ± 0,173	0,071 ± 0,068 0,000	1,025 ± 0,046 0,351 ± 0,069
γ-Glutamyltransferase	0,469 ± 0,100 0,439 ± 0,120	0,138 ± 0,090 0,817 ± 0,081	0,319 ± 0,186 0,428 ± 0,213	0,118 ± 0,092 0,054 ± 0,029	0,983 ± 0,051 0,640 ± 0,177
Cholinesterase	0,305 ± 0,197 0,296 ± 0,204	0,314 ± 0,152 0,845 ± 0,083	0,382 ± 0,183 0,402 ± 0,196	0,448 ± 0,196 0,391 ± 0,218	0,860 ± 0,170 0,416 ± 0,191
<b>Niere (Cortex)</b>					
Arylamidase	0,259 ± 0,120 0,322 ± 0,108	0,165 ± 0,112 0,879 ± 0,120	0,074 ± 0,057 0,110 ± 0,032	0,047 ± 0,031 0,070 ± 0,042	0,920 ± 0,104 0,980 ± 0,090
Alkalische Phosphatase	0,605 ± 0,109 0,679 ± 0,141	0,203 ± 0,094 0,866 ± 0,282	0,070 ± 0,051 0,273 ± 0,147	0,070 ± 0,049 0,052 ± 0,031	0,917 ± 0,090 0,413 ± 0,081
γ-Glutamyltransferase	0,960 ± 0,075 0,848 ± 0,091	0,470 ± 0,143 0,939 ± 0,134	0,161 ± 0,078 0,354 ± 0,119	0,286 ± 0,101 0,061 ± 0,033	1,008 ± 0,028 0,709 ± 0,066
Cholinesterase	0,325 ± 0,131 0,365 ± 0,152	0,314 ± 0,109 0,843 ± 0,112	0,313 ± 0,105 0,362 ± 0,130	0,394 ± 0,166 0,505 ± 0,178	0,968 ± 0,135 0,472 ± 0,129
<b>Pankreas</b>					
Arylamidase	0,538 ± 0,180 0,458 ± 0,124	0,397 ± 0,243 0,848 ± 0,224	0,259 ± 0,148 0,268 ± 0,137	0,169 ± 0,056 0,196 ± 0,088	0,639 ± 0,145 0,675 ± 0,150
Alkalische Phosphatase	0,484 ± 0,159 0,409 ± 0,138	0,127 ± 0,090 0,728 ± 0,103	0,126 ± 0,079 0,358 ± 0,127	0,100 ± 0,069 0,058 ± 0,026	0,757 ± 0,166 0,533 ± 0,204
γ-Glutamyltransferase	0,546 ± 0,260 0,504 ± 0,242	0,276 ± 0,223 0,773 ± 0,187	0,319 ± 0,209 0,440 ± 0,223	0,119 ± 0,044 0,060 ± 0,038	0,702 ± 0,263 0,819 ± 0,214
Cholinesterase	0,411 ± 0,166 0,563 ± 0,181	0,377 ± 0,191 0,788 ± 0,100	0,419 ± 0,179 0,470 ± 0,243	0,492 ± 0,184 0,580 ± 0,137	0,864 ± 0,266 0,662 ± 0,291
<b>Jejunummucosa</b>					
Arylamidase	0,815 ± 0,150 0,670 ± 0,172	0,548 ± 0,370 0,832 ± 0,262	0,255 ± 0,132 0,317 ± 0,151	0,395 ± 0,195 0,361 ± 0,182	0,905 ± 0,184 0,921 ± 0,161
Alkalische Phosphatase	0,585 ± 0,189 0,562 ± 0,158	0,467 ± 0,264 0,918 ± 0,212	0,340 ± 0,185 0,740 ± 0,208	0,450 ± 0,267 0,375 ± 0,237	0,991 ± 0,040 0,973 ± 0,062
γ-Glutamyltransferase	0,595 ± 0,134 0,399 ± 0,111	0,320 ± 0,171 0,853 ± 0,152	0,315 ± 0,156 0,382 ± 0,162	0,273 ± 0,107 0,312 ± 0,097	1,014 ± 0,028 0,900 ± 0,092
Cholinesterase	0,135 ± 0,104 0,115 ± 0,092	0,074 ± 0,048 0,494 ± 0,218	0,113 ± 0,100 0,208 ± 0,152	0,115 ± 0,043 0,230 ± 0,138	0,971 ± 0,102 0,955 ± 0,141
<b>Knochen</b>					
Alkalische Phosphatase	0,492 ± 0,215 0,530 ± 0,242	0,215 ± 0,113 0,763 ± 0,272	0,102 ± 0,078 0,314 ± 0,117	0,044 ± 0,028 0,092 ± 0,038	0,980 ± 0,022 0,621 ± 0,312

## Diskussion

Die Ergebnisse dieser Studie entsprachen der Bindung gereinigter Glykoenzyme durch trägergebundene Lektine. So stimmten die Reaktionen von  $\gamma$ -Glutamyltransferase (26, 27) und alkalischer Phosphatase (28) gut mit unseren Daten überein. Dasselbe gilt für Befunde von Huseby (29) mit gereinigter  $\gamma$ -Glutamyltransferase aus Leber, Niere und Pankreas, gefällt mit gelösten Lektinen. Demnach reagieren die in hohem Überschuß vorliegenden Lektine auch in Gegenwart anderer Glykoproteine stöchiometrisch mit den Enzymen des partikelfreien Überstandes. Ähnlich gut korrespondierte die Fällung von alkalischer Phosphatase durch Agglutinin 120 aus *Ricinus communis* mit dem Galaktosegehalt der hepatischen und der intestinalen Aktivität (17). Dagegen zeigte von den Arylamidasen aus Leber, Niere und Pankreas das Leberenzym nur eine Fällung mit Concanavalin A (30) und präzipitierte mit den Lektinen aus *Triticum vulgare* und *Phaseolus vulgaris* S – im Gegensatz zu unseren Beobachtungen – erst nach Inkubation mit Neuraminidase.

Für die hieraus abzuleitende sterische Reaktionshemmung durch endständige N-Acetylneuraminsäure sprachen nur die nach ihrer Abspaltung zunehmende Fällung durch Agglutinin 120 aus *Ricinus communis* und – in geringerem Ausmaß – *Glycine max*-Lektin. Beide sind gegen Galaktose, die vorher in präterminaler Position war, und nunmehr frei zugänglich ist, gerichtet. Eine ähnliche Reaktionszunahme mit den Lektinen aus *Canavalia ensiformis* und *Phaseolus vulgaris* S erscheint, trotz gegenteiliger Befunde mit Coeruloplasmin (31), danach auch theoretisch ausgeschlossen, da die ihnen entsprechenden Mannose- oder Glucose- bzw. N-Acetylgalaktosaminreste oder die Sequenz Galaktose( $\beta$ -1,4)-N-Acetylglucosamin( $\beta$ -1,2)-Mannose (32) durch die Entfernung des Sialylrestes nicht exponiert werden.

Vielmehr beobachteten wir eine stärkere Concanavalin A-Reaktion mit Sialoenzymen, vor allem bei Leberextrakten. Dies entspricht Mitteilungen über die alkalische Phosphatase des Dünndarms (33, 34, 35) und eigenen Untersuchungen an Seren (1). Die Ursache dieses Verhaltens bleibt unklar. Eine Abnahme der Lektinbindung, die Shaw et al. (12) durch tryptische Behandlung von  $\gamma$ -Glutamyltransferase bei unveränderter Aktivität erzielten, ist wegen der mitgeführten Kontrollansätze ohne Neuraminidase jedoch auszuschließen.

Obwohl in den partikelfreien Extrakten eher ein organotypisches als ein enzymspezifisches Verhalten der Aktivitäten, vor allem der Leberenzyme vor und nach Einwirkung von Neuraminidase vorlag, bestand kein Zusammenhang zwischen der Lektinbindung derselben Enzyme in Seren von Gesunden und Carcinomträgern und den Extrakten aus normalem und entartetem Lebergewebe.

Ähnliches gilt für die Muster der multiplen Formen. Den komplexen Zymogrammen des Serums standen nur wenige und gleichermaßen lektinempfindliche Fraktionen in den Extrakten gegenüber. Da  $\gamma$ -Glutamyltransferase in Pherogrammen von Seren in bis zu drei Zonen vorkommt (36), die durch Interaktion des Enzyms mit Lipiden und Proteinen entstehen (37), ist deren Veränderung allein durch die Gegenwart von Triton denkbar (29). Dem widerspricht hingegen die Tatsache, daß nur 3% der  $\gamma$ -Glutamyltransferaseaktivität von Serum in hydrophober Bindung vorliegen und durch Triton freizusetzen sind (38). Vielmehr reflektiert die  $\gamma$ -Glutamyltransferase des Serums zu über 84% das durch Papainbehandlung lösliche Enzym der Leber (38). Da die Aktivitäten aus Serum, Leber und Niere immunologische Identität aufweisen (39), sich aber deutlich in der Ladung (39) und weniger im Molekulargewicht (38) unterscheiden, dürfte ihre Heterogenität auf unterschiedlichem Gehalt an Sialinsäure (29) und Kohlenhydraten beruhen.

Diese Ursache wurde bereits für das Auftreten eigenständiger Formen der alkalischen Phosphatase (20) und Arylamidase (21) im Serum postuliert, da sich diese Enzyme in ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit nicht durch Triton-, sondern durch Neuraminidase-Behandlung verändern. Offenbar modifizieren Membran-Glykosyltransferasen das Enzymmolekül beim Übertritt in den Intravasalraum so nachhaltig, daß die Lektinaffinität der zirkulierenden Formen keine diagnostische Zuordnung zum Ursprungsort mehr erlaubt.

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Barbara Flatter für ihre ausgezeichnete technische Assistenz bei allen Untersuchungen.

## Literatur

1. Lorentz, K., Flatter, B. & Kolle, F. W. (1979) diese Z. 17, 757–765.
2. Richterich, R. (1971) Klinische Chemie, 3. Aufl., S. 305–309, Verlag S. Karger, Basel.
3. Lorentz, K., Koch, C.-D., Flatter, B. & Molz, J. (1975) diese Z. 13, 49–52.
4. Hausamen, T. U., Helger, R., Rick, W. & Gross, W. (1967) Clin. Chim. Acta 15, 241–245.
5. Szasz, G., Weimann, G., Stähler, F., Wahlefeld, A. W. & Persijn, J. P. (1974) diese Z. 12, 228.
6. Knedel, M. & Böttger, R. (1967) Klin. Wochenschr. 45, 325–327.
7. Lorentz, K., Flatter, B. & Augustin, E. (1979) Clin. Chem. 25, 1714–1720.
8. Lorentz, K. & Flatter, B. (1977) diese Z. 15, 101–108.
9. Patel, S. & O'Gorman, P. (1973) Clin. Chim. Acta 49, 11–17.

10. Schmidt, E. & Schmidt, F. W. (1970) *Enzymol. Biol. Clin.* 11, 67–129.
11. Huseby, N.-E. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 483, 46–56.
12. Shaw, L. M., London, J. W. & Petersen, L. E. (1978), *Clin. Chem.* 24, 905–915.
13. Shaw, L. M., Petersen-Archer, L., London, J. W. & Marsh, E. (1980), *Clin. Chem.* 26, 1523–1527.
14. Komoda, T. & Sakagishi, Y. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 438, 138–152.
15. Dubach, U. C. & Schmidt, U. (1970) *Enzymol. Biol. Clin.* 11, 32–51.
16. Tate, S. S. & Ross, M. E. (1977) *J. Biol., Chem.* 252, 6042–6045.
17. Komoda, T. & Sakagishi, Y. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 445, 645–660.
18. Greenberg, E., Wollaeger, E. E., Fleisher, G. A. & Engstrom, G. W. (1967) *Clin. Chim. Acta* 16, 79–89.
19. Delbrück, A. (1970) *Enzymol. Biol. Clin.* 11, 130–153.
20. Lorentz, K., Flatter, B. & Heydrich, D. (1974) *diese Z.* 12, 81–86.
21. Lorentz, K., Marunowski, A. & Ritter, U. (1974) *diese Z.* 12, 468–473.
22. Peters, B. P., Ebisu, S., Goldstein, I. J. & Flashner, M. (1979) *Biochemistry* 18, 5505–5511.
23. Monsigny, M., Roche, A.-C., Sene, C., Maget-Dana, R. & Delmotte, F. (1980) *Eur. J. Biochem.* 104, 147–153.
24. Greenaway, P. J. & LeVine, D. (1973) *Nature (London)* New Biol. 241, 191–192.
25. Köttgen, E. & Gerok, W. (1976) *Klin. Wochenschr.* 54, 439–444.
26. Shaw, L. M. & London, J. W. (1979) *Clin. Chem.* 25, 1155.
27. Shaw, L. M. & Petersen-Archer, L. (1979) *Clin. Biochem.* 12, 256–260.
28. Lehmann, F.-G. (1980), *Klin. Wochenschr.* 58, 947–951.
29. Huseby, N.-E. (1981) *Clin. Chim. Acta* 111, 39–45.
30. Sidorowicz, W., Hsia, W.-Ch., Maslej-Zownir, O. & Behal, F. J. (1980) *Clin. Chim. Acta* 107, 245–256.
31. Dulaney, J. T. (1979) *Anal. Biochem.* 99, 254–267.
32. Debray, H., Decout, D., Strecker, G., Montreuil, J. & Monsigny, M. (1979) *Prot. Biol. Fluids* 27, 451–454.
33. Higashino, K., Otani, R., Kudo, S. & Yamamura, Y. (1977) *Clin. Chem.* 23, 1615–1623.
34. Komoda, T. & Sakagishi, Y. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 523, 395–406.
35. Chang, C.-H., Angellis, D. & Fishman, W. H. (1975) *Mol. Cell. Biochem.* 9, 55–57.
36. Echetubu, Z. O. & Moss, D. W. (1979) *Clin. Chim. Acta* 95, 433–441.
37. Huseby, N.-E. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 522, 354–362.
38. Tsuji, A., Matsuda, Y. & Katunuma, N. (1980) *Clin. Chim. Acta* 104, 361–366.
39. Tsuchida, S., Imai, F. & Sato, K. (1980), *J. Biochem. (Tokyo)* 89, 775–782.

Prof. Dr. Klaus Lorentz  
Kronsforder Allee 71–73  
D-2400 Lübeck

